



DiaMetra



ESTRADIOL SALIVA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de estradiol en la saliva.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO022

USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de estradiol en la saliva.

El kit Estradiol Saliva está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

El estradiol es una hormona sexual. Representa el estrógeno principal en los seres humanos. El estradiol afecta al funcionamiento reproductivo y sexual, e interfiere en otros órganos, incluida la estructura ósea. Durante los años fértiles, la mayor parte de estradiol en las mujeres se produce por los ovarios, y pequeñas cantidades se producen por la corteza suprarrenal. En los hombres, los testículos produce el estradiol.

Los niveles de estrógenos durante el embarazo aumentan constantemente hacia el final. Los aumentos de los niveles de estradiol llevan a la síntesis de la placenta. En las mujeres con premenopausia, la producción ovárica de estradiol se estimula por la hormona luteinizante (LH) y por la hormona estimulante del folículo (FSH) durante el ciclo menstrual.

En las mujeres, los niveles de estradiol miden la fertilidad y las irregularidades menstruales, y son necesarios para controlar el funcionamiento de los folículos ováricos durante la inducción de la ovulación. En las mujeres, el estradiol actúa como hormona para el desarrollo de los tejidos de los órganos reproductores.

El estradiol se ocupa del desarrollo de las características sexuales secundarias en las mujeres. El estradiol está involucrado en la fertilidad masculina.

El estradiol regula el mantenimiento de la masa ósea. Las mujeres con menopausia sufren una pérdida acelerada de la masa ósea debida a la falta de estrógenos. El estradiol afecta a la síntesis de las proteínas, como las lipoproteínas, las proteínas transportadoras y las proteínas responsables de la coagulación.

Los estrógenos tienen una función neuroprotectora. El estradiol se considera un oncógeno, ya que está involucrado en algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama y el cáncer del revestimiento uterino. Además, existen distintas circunstancias

ginecológicas benignas que dependen de los estrógenos, como por ejemplo la endometriosis.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El estradiol (antígeno) presente en la muestra compete con el antígeno marcado con peroxidasa frente al anticuerpo anti-estradiol absorbido en la microplaca (fase sólida).

La separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

La enzima presente en la fracción unida cataliza la reacción entre el sustrato (H₂O₂) y el sustrato TMB (TMB), desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (H₂SO₄).

La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de estradiol "libre" presente en la muestra.

La concentración de Estradiol en la muestra se calcula tomando como base una curva estándar.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Estándares (STD) de estradiol (5 frascos, 1 mL cada uno)

STD0	REF DCE002/2206-0
STD1	REF DCE002/2207-0
STD2	REF DCE002/2208-0
STD3	REF DCE002/2209-0
STD4	REF DCE002/2210-0

2. Tampón de incubación (1 frasco, 30 mL)

Tampón HEPES pH 7,5 BSA 1 g/L; conservantes

REF DCE001/2201-0

3. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Estradiol conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/2202-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

IgG-anti-estradiol absorbido en la microplaca

REF DCE002/2203-0

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)
 Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel) **REF DCE005-0**
7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)
 NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.
 Lector de microplacas (450 nm)
 Dispositivo para la obtención de saliva (*Saliva Collection Device*) **REF DKO063**

Nota

Conservar los reactivos a 2-8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

4. PRECAUCIONES

- Los reactivos contienen Proclin 300^R como conservante.
- Evitar la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz directa del sol, metales u oxidantes.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y en la dispensación de los reactivos.
- No usar reactivos de distintos lotes.
- Este método permite determinar concentraciones de estradiol de 1 pg/mL a 100 pg/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles salivales de estradiol.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Preparación de los estándares

(S₀, S₁, S₂, S₃, S₄)

Antes del uso, dejar durante al menos 5 minutos en el agitador giratorio.

Los estándares tienen las siguientes concentraciones de estradiol:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
pg/mL	0	1	5	20	100

Estables 6 meses a 2-8°C desde la apertura de los frascos.

Unidades del SI: ng/mL x 3.76 = nmol/L

5.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50x) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días.

5.3. Preparación del conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes del uso.

Diluir 10 µL de conjugado (reactivo 3) con 1 mL de tampón de incubación (reactivo 2). Mezclar con cuidado. Estable durante 3 horas a temperatura ambiente (22-28°C).

5.4. Preparación de la muestra

Para la obtención de la muestra se recomienda usar tubos de vidrio de centrífuga y una cánula de plástico, o el dispositivo para la obtención de saliva (*Saliva Collection Device*) de Diametra.

Se recomienda no usar dispositivos de obtención disponibles en el mercado, como "SALIVETTE". Los otros tipos de dispositivos de obtención disponibles en el mercado no se han comprobado.

5.4.1. Método y limitaciones

Obtener las muestras de saliva en los tiempos indicados.

Si no se dan indicaciones específicas para la obtención de saliva, es posible obtener las muestras en cualquier momento, pero teniendo en cuenta los siguientes factores:

- Si la obtención de saliva debe realizarse por la mañana, deberá realizarse antes de lavarse los dientes.
- Durante el día, esperar al menos una hora tras haber comido o bebido antes de obtener las muestras de saliva
- Es muy importante obtener una muestra limpia (no contaminada con comida, cosméticos, sangre, chicle u otros materiales extraños).

5.4.2. Procesamiento de la saliva

Hacer fluir la saliva a través de la cánula hasta el tubo de vidrio.

- Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 3000 rpm
- Dejar a -20 °C durante al menos 1 hora
- A continuación, descongelar la muestra.
- Centrifugar durante otros 15 minutos a 3000 rpm
- La muestra de saliva está lista para el ensayo.
- Conservar la muestra a 2-8 °C durante una semana o a -20 °C para períodos más largos.

5.5. Procedimiento

Puesto que es necesario operar por duplicado, preparar dos pocillos para cada punto de la curva estándar (S₀-S₄), dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Estándar	Muestra	Blanco
Estándares S ₀ -S ₄	100 µL		
Muestras		100 µL	
Conjugado diluido	100 µL	100 µL	
Incubar a 37°C durante 2 h. Retirar la mezcla de reacción, lavar los pocillos 3 veces añadiendo 0,3 mL de solución de lavado diluida.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22±28 °C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente al blanco.			

6. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar controles para los rangos bajo, medio y alto de estradiol para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva estándar para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

7. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

7.1. Rendimiento del análisis

No usar muestras contaminadas microbiológicamente, ni muestras muy lipémicas o hemolizadas. Es importante que el tiempo de reacción de cada pocillo sea el mismo para obtener resultados reproducibles. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe ser superior a 10 minutos. Si dura más de 10 minutos, se recomienda seguir el orden de dispensación. Si se usa más de una microplaca, repetir la curva estándar para cada placa. La adición del substrato TMB inicia una reacción cinética que se termina con la adición de la solución de parada. La adición del substrato y de la solución de parada debe realizarse en la misma secuencia para evitar distintos tiempos de reacción. Los lectores de microplacas miden las DO verticalmente. No tocar el fondo de los pocillos. Si no se aspira

completamente la solución de lavado de los pocillos se pueden producir replicaciones pobres y resultados falsos.

7.2. Interpretación de los resultados

Si para calcular los resultados se ha usado el ordenador, es imprescindible que los valores de los calibradores se encuentren dentro del 10 % de las concentraciones asignadas.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva estándar (S₀-S₄) y de cada muestra.

8.2. Curva estándar

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (Em) de cada estándar (S₀-S₄) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos estándar (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolarse del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en pg/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

Puesto que los valores de estradiol en la saliva tienen un ritmo circadiano, se recomienda obtener las muestras a la misma hora (8 a.m.):

Se deben usar los siguientes valores como guía preliminar hasta que cada laboratorio establezca su propio rango de normalidad.

		pg/mL
MUJERES:	fase folicular	1 – 20
	Pico ovulatorio	10 – 40
	Fase lútea	5 – 25
	Menopausia	< 10
NIÑOS:		< 20
HOMBRES:		< 20

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de dos muestras de control distintas. La variabilidad intraensayo es ≤ 10,3%.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres muestras de control distintas con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es ≤ 13,6%.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra de saliva enriquecida con 2,5 – 10 – 50 pg/mL de estradiol ha dado un valor medio (±SD) de 106,84% ± 7,80%.

10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de estradiol medible que puede distinguirse del estándar cero es 0,5 pg/mL con un límite de confianza del 95%.

10.4. Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según Abraham:

Estradiol	100%
Estrona	2%
Estriol	0,39%
Testosterona	0,02%
Cortisol	$< 7 \times 10^{-3} \%$
Progesterona	$< 3 \times 10^{-4} \%$
Dhea-s	$< 1 \times 10^{-4} \%$

10.5. Correlación

El kit Estradiol saliva (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 22 muestras de saliva. La curva de regresión es:

$$(\text{Kit Diametra}) = 0,98 * (\text{Kit Elisa DRG}) + 0,08$$

$$r^2 = 0,961$$

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Joshi, U.M., et al, Steroids 34 (1) 35(1979)
2. D.Exley and R. Abuknesha, Febs Letters 91,(2) 162 (1978)
3. Ismail, et al J. Clin:Endocrin. Metab: 34,177-184 (1972)
4. Rajkowski K.M.,et al Steroids 29 - 5 (1977)
5. Wisdom G.B., Clin. Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)
6. D. Sadem, et al J. of Immunological Meth. 28 125-131 (1979)
7. C.M.Worthman, et al Clin. Chem. 36/10 1769 – 1773 (1990)
8. Y. Lu, et al Fertility and Sterility Vol 71, No.5, May 99

Ed 11/2010

DCM022-8

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595 – Fax 0039–02–2133354.

Manufactory: Via Giustozzi, 35/35a – Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italy
Tel. 0039-0742–24851 Fax 0039–0742–316197
E-mail: info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

IT
Spiegazione dei simboli











GB
Explanation of symbols

FR
Explication des symboles

ES
Significado de los símbolos

DE
Verwendete Symbole

PT
Explicação dos símbolos

	<p>DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro</p>		<p>DE Hergestellt von ES Fabricante FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por</p>
REF	<p>DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo</p>	 yyyy-mm	<p>DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricación FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção</p>
 yyyy-mm-dd	<p>DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes del último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)</p>		<p>DE Biogefährdung ES Riesgo biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico</p>
	<p>DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones de uso FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso</p>		<p>DE Chargenbezeichnung ES Código del lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote</p>
 $\Sigma = xx$	<p>DE Ausreichend für "h" Tests ES Contenido suficiente para "h" ensayos FR Contenu suffisant pour "h" tests GB Contains sufficient for "h" tests IT Contenuto sufficiente per "h" saggi PT Contém o suficiente para "h" testes</p>		<p>DE Inhalt ES Contenido del kit FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit</p>
 Max Min	<p>DE Temperaturbereich ES Límites de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação</p>		

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS/TROUBLESHOOTING

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation